

Requested Patent: JP7196529A

Title: WOUND-CURING AGENT, COSMETIC AND HAIR TONIC ;

Abstracted Patent: JP7196529 ;

Publication Date: 1995-08-01 ;

Inventor(s): SHIMAMURA SEIICHI; others: 03 ;

Applicant(s): MORINAGA MILK IND CO LTD ;

Application Number: JP19930352423 19931229 ;

Priority Number(s): ;

IPC Classification: A61K38/16; A61K7/00; A61K7/06; A61K38/00; A61K38/22 ;

Equivalents: ;

ABSTRACT:

PURPOSE: To obtain a wound-curing agent, a cosmetic and a hair tonic being safe and having excellent effect.

CONSTITUTION: This wound-curing agent, this cosmetic and this hair tonic contain lactoferrins, hydrolyzates of lactoferrins or their mixture and an epidermal growth factor, respectively.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-196529

(43) 公開日 平成7年(1995)8月1日

(51) IntCl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 38/16	ADS			
7/00	K			
7/06				
		A 6 1 K 37/ 14	ADS	
		37/ 18		
審査請求 未請求 請求項の数3 F D (全 7 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平5-352423
(22) 出願日 平成5年(1993)12月29日

(71) 出願人 000006127
森永乳業株式会社
東京都港区芝5丁目33番1号
(72) 発明者 島村 誠一
神奈川県横浜市港北区篠原町1558
(72) 発明者 福渡 康夫
神奈川県川崎市麻生区虹ヶ丘3-1-4-103
(72) 発明者 篠田 一三
神奈川県座間市東原5-1-15-104 さがみ野さくら
(74) 代理人 弁理士 西澤 利夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 創傷治癒剤、化粧品および養毛剤

(57) 【要約】

【目的】 安全で優れた効果を有する創傷治癒剤、化粧品および養毛剤を提供する。

【構成】 ラクトフェリン類、ラクトフェリン類の加水分解物、またはこれらの混合物と上皮細胞成長因子とを含有する含有する創傷治癒剤、化粧品および養毛剤。

11	12
炭酸カルシウム	0.3
精製水	94.599

上記成分を配合して、100gのパックを製造した。なお、ラクトフェリン加水分解物およびEGF以外の原料*

*はいずれも市販品を用いた。

実施例6 (ボマード)

ラクトフェリン (オレオフィナ社製)	1.0 (g)
試験例1と同一の方法によるラクトフェリン加水分解物	1.0
参考例2と同一の方法によるEGF	0.001
モクロウ	13.0
ヒマシ油	84.799
香料	0.2

上記成分を配合して、100gのボマードを製造した。
なお、ラクトフェリン加水分解物およびEGF以外の原料はいずれも市販品を用いた。

【発明の効果】以上詳しく説明したとおり、この発明によって、安全で優れた効果を有する創傷治癒剤、化粧品および養毛剤が提供される。

【0040】

フロントページの続き

(51)Int. Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 61 K 38/00				
38/22	ADA		A 61 K 37/24	ADA

(72)発明者 萩原 朋之

神奈川県横浜市旭区鶴ヶ峰1-89-33

マ・メゾンV2-C号室

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ラクトフェリン類、ラクトフェリン類の加水分解物またはこれらの混合物と上皮細胞成長因子とを有効成分として含有する創傷治癒剤。

【請求項2】 ラクトフェリン類、ラクトフェリン類の加水分解物またはこれらの混合物と上皮細胞成長因子とを有効成分として含有する化粧料。

【請求項3】 ラクトフェリン類、ラクトフェリン類の加水分解物またはこれらの混合物と上皮細胞成長因子とを有効成分として含有する養毛剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 この発明は、創傷治癒剤、化粧料および養毛剤に関するものである。さらに詳しくは、この発明は、ラクトフェリン類、ラクトフェリン類の加水分解物またはこれらの混合物と上皮細胞成長因子とを有効成分として含有する創傷治癒剤、化粧料、および養毛剤に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 上皮細胞成長因子 (epidermal growth factor)。以下EGFと記載することがある) は、多種多様な細胞に対して細胞増殖作用を有する分子量約 6,000 のペプチドであり、哺乳類のすべての体液中に含まれている。EGFの発見は1962年と極めて古く、以来様々な応用研究が盛んに行われ、EGFに創傷治癒効果があること [ジャーナル・オブ・サージカル・リサーチ (Journal of Surgical Research)、第33巻、第164ページ、1982年、およびジャーナル・オブ・エキスペリメンタル・メディシン (Journal of Experimental Medicine)、第163巻、第1319ページ、1986年]、EGFが角膜損傷の治癒に有効であること [エキスペリメンタル・アイ・リサーチ (Experimental Eye Research)、第40巻、第47ページ、1985年、およびインベスティゲイティブ・オブサルモロジー・アンド・ビジュアル・サイエンス (Investigative Ophthalmology & Visual Science)、第26巻、第105ページ、1985年] 等が明らかにされている。

【0003】 これらの知見に基づき、EGFを皮膚用剤に応用した例も知られている。すなわち、皮膚に対しては、皮膚細胞の賦活化、新陳代謝の促進、創傷治癒効果等により、滑らかでしっとりした若々しい肌を与え、毛髪に対しては、毛母細胞の賦活化、毛髪の成長促進、抜毛防止効果等により養毛、育毛および脱毛防止作用を与える皮膚用剤が提案されている (特開昭61-5006号公報)。

【0004】 一方、ラクトフェリン (lactoferrin、以下Lfと記載することがある) は、母乳中に極めて多量に含まれている分子量約 80,000 の鉄結合性蛋白質であって、大腸菌、カンジダ菌、クロストリジウム菌、ブドウ球菌等の有害微生物に対して抗菌作用を示すこと

が知られている [ジャーナル・オブ・ペディアトリクス (Journal of Pediatrics)、第94巻、第1ページ、1979年、およびジャーナル・オブ・デイリー・サイエンス (Journal of Dairy Science)、第67巻、第60ページ、1984年]。

【0005】 また最近では、ラット小腸上皮クリプト細胞およびマウス線維芽細胞Ba1b/c3T3のDNA合成がLfにより促進されることが明らかにされ [ペディアトリック・リサーチ (Pediatric Research)、第21巻、第563ページ、1987年、およびアグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー (Agricultural and Biological Chemistry)、第53巻、第31ページ、1989年]、新たな細胞増殖刺激因子として注目されている。

【0006】 Lfおよびその分解物については、抗菌性およびチロシナーゼ活性阻害 (ヨーロッパ特許公開第438750号)、細胞への病原菌付着防止 (特開平3-220130号公報)、抗ウイルス作用 (特開平1-233226号公報) 等が知られてもいる。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】 従来より、EGFを有効成分として含有する創傷治癒剤、皮膚用剤等が知られていたが、それらの効果は必ずしも十分なものではなかった。

【0008】 一方、この発明の発明者等は、ラクトフェリン類およびその加水分解物の生物学的活性について研究を行っていたが、新たに次のような事実を発見した。

【0009】 ①ラクトフェリン類がEGFと相乗的に作用してラクトフェリン単独およびEGF単独の場合より強力な細胞の成長または増殖促進作用を有すること。

【0010】 ②一般に、蛋白質は、加水分解された場合にはその生物学的活性を失うが、ラクトフェリン類の加水分解物はラクトフェリンが有している作用を保持し、EGFと相乗的に細胞の成長または増殖促進作用を発揮すること。

【0011】 この発明は、以上のとおりの新規な事実に基づいてなされたものであり、従来のEGFが単独添加された薬剤または皮膚用剤よりもより効果的な創傷治癒剤、化粧料、および養毛剤を提供することを目的としている。

【0012】

【課題を解決するための手段】 この発明は、上記の課題を解決するものとして、ラクトフェリン類、ラクトフェリン類の加水分解物またはこれらの混合物と上皮細胞成長因子とを有効成分として含有する創傷治癒剤を提供する。

【0013】 またこの発明は、ラクトフェリン類、ラクトフェリン類の加水分解物またはこれらの混合物と上皮細胞成長因子とを有効成分として含有する化粧料を提供する。さらにこの発明は、ラクトフェリン類、ラクト

あった。同様に、EGFとbL F-Hyを添加した試料5でも、細胞数は増加し培養6日目では580%であった。以上のように、EGFとbL fを共存させること、およびEGFとbL f-Hyと共存させることで細胞が著しく増殖することが明らかになった。なお、bL fおよびbL f-Hyの種類を変更して試験したが、ほぼ同様の結果が得られた。

【0026】

【表1】

試料	細胞数 (相対値)
対 照	100
試料1	475
試料2	315
試料3	280
試料4	801
試料5	580

【0027】試験例2

この試験は、細胞増殖活性に対するL f分解物の有効量を調べるために行った。なお、細胞増殖活性は、³H-チミジンの取り込み量で評価した。

(1) 試料の調製

bL f-Hyの調製は試験例1に従った。

(2) 試験方法

Swiss 3T3細胞を48穴カルチャープレートに1穴当たり5000個ずつ時き、10%牛胎児血清を含むダルベッコ変法イーグル培養液（日水製薬社製。以下FBS-DMEMと略記する）で細胞がコンフルエントになるまで培養した（培養液は、1穴当たり0.5ml使用した）。培養液を1%FBS-DMEMに交換し、さらに2日培養し、細胞を静止期に導入した。細胞をDMEM（0.5ml）で一度洗浄した後、表2に示す濃度のbL f-Hyを含むDMEM（0.3ml）、10ng/mlのEGFと種々の濃度のbL f-Hyを含むDMEM（0.3ml）に交換し、19時間培養した。培養液を³H-チミジン（ICNバイオメディカルズ社製。1μC/ml）を含むDMEM（0.15ml）に交換し、さらに2時間培養した。細胞をリン酸緩衝液〔PBS（-）、1ml〕で2度洗浄し、のち氷冷5%トリフルオロ酢酸（TFA、1ml）を加え、冷蔵庫に1時間放置した。細胞を5%TFA（1ml）で2度洗浄し、1規定の水酸化ナトリウム（0.2ml）を加え、37℃で1時間放置し、細胞を溶解した。6規定の塩酸（0.04ml）を加え、中和し、のちDNAに取り込まれた³H-チミジン量を液体シンチレーションカウンター（LKB社製）で測定した。

(3) 試験結果

この試験の結果は、表2に示すとおりである。表2から明らかなように、EGFを10ng/ml添加した群の³H-チミジンの取り込み量は、2119であり、無添加対照群の³H-チミジンの取り込み量（1677）の

126%であった。bL f-Hyを50μg/ml、150μg/mlを添加した群の³H-チミジンの取り込み量は、それぞれ2013および2315であり、無添加対照群の120%および138%に相当し、EGFと同様、細胞増殖活性が認められた。EGFを10ng/mlとbL f-Hyを17μg/ml、50μg/ml、150μg/ml添加した群の³H-チミジンの取り込み量は、それぞれ、2284、2955、2969であった。これらの値は、それぞれ無添加対照群の136%、176%、177%に相当し、EGF存在下、³H-チミジンの取り込み量がbL f-Hyの用量に対応して飛躍的に増大したことが明らかになった。なお、bL f-Hyの種類を変更した試験およびbL f-Hyの代わりにbL Fを用いた試験でもほぼ同様の結果が得られた。

【0028】

【表2】

bL f-Hyの 濃度 (μg/ml)	H-チミジンの取り込み量 (cpm)	
	EGF無添加 (n=4)	EGF添加 (n=4)
0 (対照)	1677 ± 388	2119 ± 70
1.9	1130 ± 368	2119 ± 70
5.7	1025 ± 41	1130 ± 38
17	1596 ± 200	2284 ± 219
50	2013 ± 44	2955 ± 167
150	2315 ± 232	2969 ± 197

(注)

- EGFの添加量は、10ng/mlである。
- ±以後の数字は、S. D. を示す。

【0029】参考例1（アポ（脱鉄）ラクトフェリンの調製）

アポラクトフェリンは、市販の牛ラクトフェリン（オレオフィナ社製）より、鈴木ら（栄養と食糧、第31巻、第395ページ、1978年）の方法により次のようにして調製した。

【0030】1%ラクトフェリン水溶液1lを20倍量の0.05%EDTAを含む0.1モルのクエン酸溶液（pH2.2）に対し、4℃下で30時間透析し、さらに、脱イオン水に対して24時間透析し、凍結乾燥し、約10gのアポラクトフェリンを得た。

参考例2（EGFの調製）

EGFは、コーエンおよびカーペンターの方法〔エス・コーエンおよびジー・カーペンター：プロスィーディングズ・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユー・エス・エイ（S. Cohen and G. Carpenter: Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.）、第72巻、第1317ページ、1975年〕、サベージおよびハーバーの方法〔アナリティカル・バイオケミストリー（Analytical Biochemistry）、第111巻、第195ページ、1981年〕および西室らの方法〔ケミカル・アンド・ファーマセウティカル・プレティン

(Chemical and Pharmaceutical Bulletin)、第33巻、第4037ページ、1985年]によりヒト尿から次のようにして調製した。

【0031】約20リットルのヒト原尿に氷酢酸1リットルを加えて酸性とし、濃塩酸を加えてpHを3.0～3.3に調整した。イオン交換樹脂Bio-Rex70(バイオラッド社製)を氷酢酸でpHを3.1に調整し、5%酢酸で洗浄し、尿に加え、4℃で18時間攪拌した。2～4時間放置後上澄を廃棄し、該樹脂を0.01規定塩酸で洗浄し、1モル酢酸アンモニウム(pH 8.0)でEGFを溶出させた。溶出液を凍結乾燥し、乾燥物を50mlの蒸留水に溶解し、ベプスタチン(0.5mg)、2ミリモルのアルギニン、200mgのウシ血清アルブミン(BSA)を添加した。

【0032】この溶液に1,500mlのエタノールを加えて攪拌し、30分間放置し、1,000×gで20分間遠心し、沈査に2ミリモルのアルギニン15mlを加え、塩酸でpHを3.0に調整し、さらに、30,000×gで20分間遠心し、上澄を得た。

【0033】0.05%酢酸で平衡化したDEAEセルロース(ワットマン社製)を充填したカラム(4×14cm)にこの上澄を通液し、カラムに吸着せずに溶出するEGFを集め、溶出液を凍結乾燥し、乾燥物を20mlの0.05規定塩酸で溶解し、pHを1.5に調整し、3,000×gで30分間遠心し、上澄を得た。

【0034】Bio-GelP-10(バイオラッド社製)を充填したカラム(4×90cm)を0.05規定塩酸で平衡化し、毎時42mlの流速で溶出させた。大部分のUV吸収物質は1.5カラム容積に溶出するが、EGFは1.7カラム容積以後に溶出した。活性分画を集め、アンモニア水でpHを6.0に調整し、凍結乾燥した。乾燥物を0.04モル酢酸アンモニウム(pH 3.9)50mlに溶解し、限外濾過して5mlに濃縮*

実施例1(親水性軟膏)

ラクトフェリン(オレオフィナ社製)	10(g)
参考例2と同一の方法によるEGF	0.01
白色ワセリン	250
ステアリルアルコール	220
プロピレングリコール	120
ウラリル硫酸ナトリウム	15
パラオキシ安息香酸メチル	0.25
パラオキシ安息香酸プロピル	0.15
精製水	384.59

上記成分を配合して、1000gの親水性軟膏を製造した。なお、EGF以外の原料はいずれも市販品を用い

実施例2(クリーム)

参考例1と同一の方法によるアボラクトフェリン	1.0(g)
参考例2と同一の方法によるEGF	0.001
ポリオキシエチレンステアリルエーテル	2.0
ポリオキシエチレンセチルエーテル	3.0

*した。

【0035】CMセルロース(ワットマン社製)を充填したカラム(0.9×10cm)を0.04モル酢酸アンモニウムで平衡化し、上記濃縮液を添加し、0.04モル酢酸アンモニウムで洗浄し、のち14mlの1モル酢酸アンモニウムで溶出し、溶出液を凍結乾燥し、0.02モル酢酸アンモニウム(pH5.3)5mlに溶解した。

【0036】DE-52セルロース(ワットマン社製)を充填したカラム(0.9×10cm)を0.02モル酢酸アンモニウム(pH5.3)で平衡化し、毎時8mlの流速で溶出し、上記溶液を添加後、0.02モル酢酸アンモニウムで洗浄し、0.02～0.3モル酢酸アンモニウムの濃度勾配で溶出し、3つのピーク(1, 2, 3)を得た。これらのうちEGF活性の主要なピークは1と3であり、約150～250μgのEGFを得た。

参考例3(鉄飽和ラクトフェリンの調製)

鉄飽和ラクトフェリンは、市販の牛ラクトフェリン(オレオフィナ社製)より、鈴木らの方法(栄養と食糧、第31巻、第395ページ、1978年)により次のようにして調製した。

【0037】ラクトフェリンの1%水溶液1リットルに3ミリモルの塩化第二鉄を含む0.1モルのクエン酸ナトリウム溶液0.2リットルを加え、1時間おだやかに攪拌し、のち脱イオン水に対して24時間透析し、凍結乾燥し、約10gの鉄飽和ラクトフェリンを得た。

【0038】次に実施例を示してこの発明をさらに具体的に説明するが、この発明は以下の例に限定されるものでない。

【0039】

【実施例】

た。

9	10
ミツロウ	4.0
セタノール	3.0
ラノリン	1.0
イソプロピルパルミテート	2.0
流動パラフィン	15.0
ポリエチレングリコールモノステアレート	0.5
パラオキシ安息香酸メチル	0.1
精製水	68.399

上記成分を配合して、100gのクリームを製造した。*いずれも市販品を用いた。

なお、アポラクトフェリンおよびEGF以外の原料はい*10

実施例3 (ファンデーション)

参考例3と同一の方法による鉄飽和ラクトフェリン	1.0 (g)
参考例2と同一の方法によるEGF	0.001
ステアリン酸	2.4
モノステアリン酸プロピレングリコール	2.0
セトステアリンアルコール	0.2
液状ラノリン	2.0
流動パラフィン	3.0
ミリスチン酸イソプロピル	8.5
防腐剤	63.399
カルボキシメチルセルロースナトリウム	0.2
ベントナイト	0.5
プロピレングリコール	4.0
トリエタノールアミン	1.0
酸化チタン	8.0
タルク	4.0
着色料	適量
精製水	適量

上記成分を配合して、約100gのファンデーションを ※外の原料はいずれも市販品を用いた。

製造した。なお、鉄飽和ラクトフェリンおよびEGF以※30

実施例4 (乳液)

試験例1と同一の方法によるラクトフェリン加水分解物	2.0 (g)
参考例2と同一の方法によるEGF	0.001
自己乳化型グリセロールモノステアレート	1.1
ポリオキシエチレンセチルエーテル	1.9
MCステアリン酸	2.0
セタノール	1.0
イソプロピルミリスチート	2.0
パラオキシ安息香酸メチル	0.1
香料	0.1
精製水	89.799

上記成分を配合して、100gの乳液を製造した。な はいずれも市販品を用いた。

お、ラクトフェリン加水分解物およびEGF以外の原料

実施例5 (パック)

試験例1と同一の方法より得たラクトフェリン加水分解物

	1.0 (g)
参考例2と同一の方法によるEGF	0.001
エタノール	3.0
パラオキシ安息香酸メチル	0.1
カルボキシビニルポリマー	1.0